

斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性

刘春 李凯彬 王庆任 燕石存斌 吴淑勤

中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业部渔药创制重点实验室/广东省免疫技术重点实验室,广州 510380

摘要 从患病斑马鱼(*Danio rerio*)肝脏组织分离到菌株Z1,通过对该菌株形态特征、生理生化特性、ATB系统鉴定和16S rRNA、DNA促旋酶B亚单位蛋白(*gyrB*)基因测序等综合分析,鉴定Z1菌株为迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)。Z1菌株对健康斑马鱼和透明四带无须鲃(*Puntius tetrazona*)人工感染试验发现,感染发病症状与自然发病症状一致,再分离菌株的特性与Z1菌株相同,并再次感染成功,证实迟缓爱德华氏菌为斑马鱼病原菌。药敏试验发现Z1菌株对呋喃妥因等11种药物敏感,对苯唑西林等6种药物耐受。15种中草药对Z1菌株的体外抑菌试验结果发现,五倍子、石榴皮的抑菌作用明显,最小抑菌质量浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC)均≤6.25 mg/mL;艾叶等有一定抑菌作用,MIC和MBC均在25~200 mg/mL;而野菊花等抑菌作用不明显,MBC>200 mg/mL。

关键词 斑马鱼;迟缓爱德华氏菌;鉴定;系统发育分析;人工感染;抗菌药物敏感性

中图分类号 S 941.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0105-07

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),爱德华氏菌属(*Edwardsiella*),是革兰氏阴性、无荚膜、兼性需氧杆菌,是一种重要的条件致病性人畜共患病原菌^[1]。该菌在水环境中分布广泛,能感染鱼类、贝类、两栖类、爬行类等多种水生动物,不同国家和地区都报道过由迟缓爱德华氏菌感染引发的病害^[2~4],给水产养殖业带来巨大的经济损失。斑马鱼(*Danio rerio*)是鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)的一种小型热带观赏鱼,具有繁殖能力强、体外受精和发育、胚胎透明、性成熟周期短、个体小、易养殖等优点,现已被广泛应用于遗传学、发育生物学、毒物学、肿瘤学、免疫学和细胞凋亡的研究。斑马鱼具有类似哺乳动物的天然免疫和获得性免疫系统^[5~7],最近斑马鱼作为感染性疾病的感染模型,越来越受到病原微生物学家的喜爱。

2012年5月广州市某观赏鱼养殖场的斑马鱼大量死亡,病鱼主要症状为鳍条充血、腹部肿胀,剖检可见脾、肾等内脏肿大、腹腔积液。该养殖场用多种类型的抗菌药物治疗,仍然没有控制住病情。笔

者从病鱼的肝脏组织中分离到1株强致病力的迟缓爱德华氏菌,对分离菌株的生物学性状、16S rRNA、*gyrB*基因序列和系统发育进行了研究,并对该菌株进行了药物敏感性试验和中草药体外抑菌试验,以期了解迟缓爱德华氏菌的致病性、控制其流行和传播,为该菌的药物防治和人畜共患病的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发病斑马鱼样本采自广州市某观赏鱼养殖场。人工感染用试验鱼:健康斑马鱼AB系(3.2~3.6 cm),健康透明四带无须鲃(3.0~3.5 cm),由珠江水产研究所水生实验动物中心提供。

大肠杆菌DH5 α 由笔者所在实验室保存。水解酪蛋白胨(MH)肉汤、5%绵羊血琼脂平板和细菌生化微量鉴定管等为广州环凯微生物有限公司产品;药敏试纸购自北京天坛药物生物技术开发公司;细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;胶回收试剂盒、dNTP、DNA Taq酶、T4连接酶、限制性内切酶、DNA分子Marker为宝生物工

收稿日期:2012-12-10

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAD25B00)、广东省鱼病防治专项“鳗鲡爱德华氏菌病害疫苗的研制与应用示范”和现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

刘春,助理研究员,研究方向:水产动物病害免疫。E-mail:lc5173483@163.com

通讯作者:吴淑勤,研究员,研究方向:水产动物病害防治与免疫。E-mail:wushuqin001@21cn.com

程(大连)有限公司产品; Plasmid Mini Kit I 为 Omega 公司产品。ATB 系统细菌自动鉴定仪为法国 Bio-merieux 公司生产。15 种中草药为艾叶 (*Folium artemisiae argyi*)、野菊花 (*Chrysanthemum indicum* L.)、金银花 (*Lonicera japonica*)、黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge)、决明子 (*Catsia tora*)、甘草 (*Glycyrrhiza glabra*)、乌梅 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)、苦参 (*Sophorae flavescentis*)、五倍子 (*Galla chinensis*)、白头翁 (*Pulsatilla chinensis*)、黄连 (*Coptis chinensis* Franch.)、大黄 (*Rheum palmatum* L.)、黄芩 (*Scutellariae baicalensis* Georgi)、黄柏 (*Phellodendri chinense* Scheeid)、石榴皮 (*Pericarpium granati*)，均购于广州采芝林药业连锁店。

1.2 病原菌的分离与纯化

从患病鱼肝脏组织取样,划线接种于 5% 绵羊血琼脂平板上,28 ℃ 培养 24 h 后,选取优势菌菌落划线纯化培养,用于进行生物学性状、生理生化分析、分子鉴定和人工感染试验。

1.3 分离菌株形态观察与生理生化特性鉴定

选取纯化分离菌株菌落,观察菌落特征。经革兰氏染色,光学显微镜观察细菌形态。根据染色结果,应用细菌生化微量鉴定管进行细菌的常规生理生化测定,并采用 ATB 系统细菌自动鉴定仪 ID32 STREP 卡进行细菌鉴定,结果参照文献[8-9]判断分离菌株的种类。

1.4 细菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列测定与分析

纯化培养的分离菌株,按照 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA。根据 GenBank 登录的爱德华氏菌 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列设计 PCR 扩增引物。16S rRNA 的上游引物为 PSF: 5'-AGAGTTT-GATCCTGGTCAGAACGAAACGCT-3', 下游引物为 PSR: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCC-3'; *gyrB* 基因上游引物为 PYF: 5'-GAAGTCATCAT-GACCGTTCTGCA-3', 下游引物为 PYR: 5'-AG-CAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3', 所有引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成。以提取的 DNA 为模板,PCR 反应条件为: 96 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环后于 72 ℃ 延伸 6 min。产物经胶回收试剂盒回收纯化,与 T 载体连接后,转化感受态细胞大肠杆菌 DH5 α ,经蓝白斑法筛选阳性克隆,挑取阳性转化子送博尚生物技术有限公司完成序列测定。

获得序列采用 Blast 进行相似性比较。并根据比较的结果,采用 MEGA 4 软件,用 N-J 法进行系统发育树的构建,并通过自举分析进行置信度检测,自举数集为 1 000。

1.5 分离菌株致病力测定

纯化培养的分离菌株,用 0.65% 无菌生理盐水洗涤并配制成悬液。分别稀释成 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 和 1×10^3 cfu/mL 5 个浓度,腹腔注射健康斑马鱼和透明四带无须鮈。斑马鱼 20 μ L/尾,透明四带无须鮈 60 μ L/尾,20 尾/组,对照组注射等量生理盐水。试验期间水温为 28~31 ℃,观察和记录试验鱼的症状和死亡情况,连续观察 11 d。从感染出现症状的病鱼中再次分离菌株并进行感染试验。

1.6 分离菌株药敏试验

药敏试验按照纸片法说明书在 5% 绵羊血平板上进行,28 ℃ 培养 24 h 后观察测量抑菌圈直径,根据文献[10]的标准判定菌株对不同药物的敏感性。

1.7 中草药体外抑菌试验

1) 药液的制备。采用水煎煮法提取中草药有效成分,操作如下:取药物 20 g,加入 200 mL 水浸泡 30 min,煎煮沸腾后文火煮 30 min,过滤,向药渣中再加入 200 mL 水继续煎煮,共煎煮 3 次,合并滤液,浓缩定容至 20 mL(药物理论的质量浓度为 1 g/mL),高压灭菌(表压 0.7 kg/cm², 115 ℃, 30 min)后 4 ℃ 保存备用。

2) 药物最小抑菌浓度的测定。参照日本化学疗法学会的标准法部分改进。用灭菌生理盐水将药液稀释至 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95 mg/mL 的 10 个倍比系列质量浓度后,在盛有 2.3 mL 无菌水解酪蛋白胨(MH 肉汤+2.0% NaCl)液体培养基的试管中分别加入 600 μ L 稀释后的药液,使各管药液终质量浓度至 200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 mg/mL。最后分别加入浓度为 3×10^7 cfu/mL 的菌液 100 μ L,同时每个试验组设只含等量菌液的阳性对照管(2.3 mL 无菌 MH 液体培养基,600 μ L 灭菌生理盐水,100 μ L 的菌液),以及不含药物和菌液的阴性对照管(2.3 mL 无菌 MH 液体培养基,700 μ L 灭菌生理盐水)各 1 支。28 ℃ 培养 36 h 后,观察无菌生长试管中的最低药物浓度,即为该药物的最小抑菌浓度(MIC)。

3) 药物最小杀菌浓度的测定。从药物的 MIC

和高于 MIC 浓度的试管中,吸取 100 μ L 培养物,接种于 5% 绵羊血琼脂平板,28 $^{\circ}$ C 培养 36 h 后,观察没有菌落生长的相应试管中的最低药物浓度,即为该药物最小杀菌浓度(MBC)。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态特征和生理生化指标

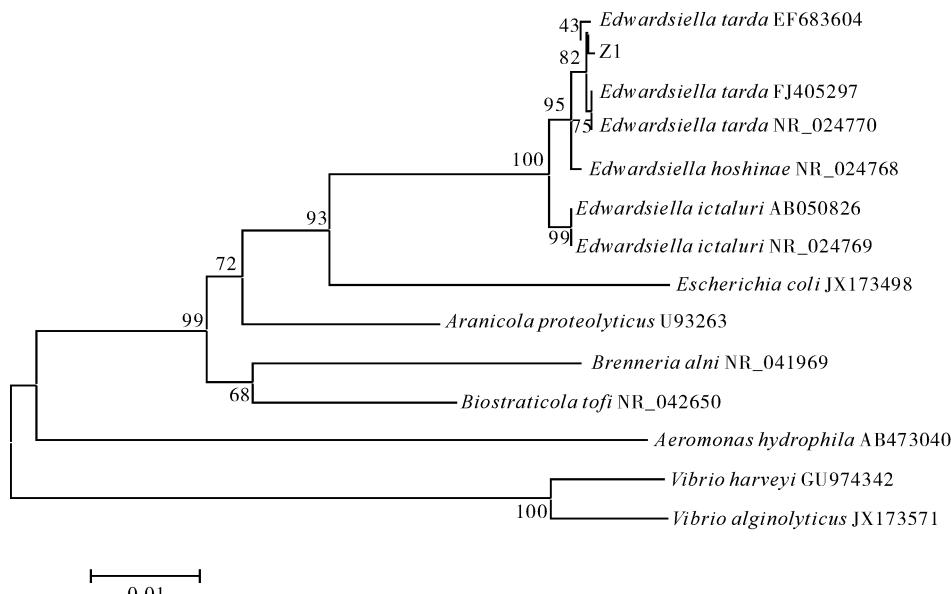
分离菌株 Z1 在 5% 绵羊血培养基 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后菌落直径为 0.5~1.0 mm, 灰白色, 呈半透明状, 均为圆形, 中间略凸起, 表面光滑湿润, 边缘整齐, β -溶血。经革兰氏染色, 判定为革兰氏阴性菌。镜检细菌为短杆状, 大小多在 1~2 μ m, 无荚膜, 不形成芽孢。

常规生理生化测定方法结合 ATB 系统细菌自动鉴定仪鉴定菌株 Z1 为迟缓爱德华氏菌。Z1 在所测项目中, 运动性、吲哚产生、甲基红、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、D-葡萄糖产酸产气、蔗糖、D-麦芽糖、溶血为阳性反应, 氧化酶、V-P 反应、精氨酸双

水解酶、明胶液化(22 $^{\circ}$ C)、脲酶、乳糖、D-甘露醇、D-木糖、海藻糖、卫矛醇、间-肌醇、侧金盏花醇、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯醇、纤维二糖、D-山梨醇、L-鼠李糖、棉籽糖、蜜二糖、七叶苷、丙二酸利用、革兰氏染色项目的反应为阴性, 该所有反应均与文献[9]中迟缓爱德华氏菌一致。

2.2 Z1 菌株的 16S rRNA、gyrB 基因序列分析

经 PCR 扩增分离菌株 Z1 的 16S rRNA 基因, 获得 1 450 bp 的片段, Blast 分析显示与 GenBank 上登录的迟缓爱德华氏菌(FJ405297)同源性最高, 为 99.9%; 经 PCR 扩增 Z1 的 gyrB 基因, 获得 1 159 bp 的片段, Blast 分析显示与 GenBank 上登录的迟缓爱德华氏菌(GU563803)同源性为 100%。2 个扩增片段均登录到 GenBank, 登录序列号分别为 KC202820 和 KC202821, 根据 Z1 菌株 16S rRNA 和 gyrB 基因序列与 GenBank 已登录的序列分别建立系统发育树, Z1 均与迟缓爱德华氏菌聚为一簇(图 1, 图 2)。



节点处数值为自展置信值, 自展重复 1 000 次。The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1 000 repetitions). 下图同。The same as below.

图 1 基于 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S ribosomal RNA sequences

2.3 分离菌株 Z1 的致病力

分离菌株 Z1 通过接种感染, 显示对斑马鱼具有较强致病力, 结果见表 1。试验组斑马鱼和透明四带无须鲃均在接种感染 24 h 后开始发病死亡, 感染鱼出现与自然发病相似的鳍条充血、内脏肿

大、腹水等症状。对照组在观察 11 d 的时间里, 无死鱼出现, 也无明显疾病症状。从感染后死鱼再次分离的菌株, 与原感染菌形态、生化特征完全相同, 并再次感染成功, 证实所分离的菌株为斑马鱼的致病菌。

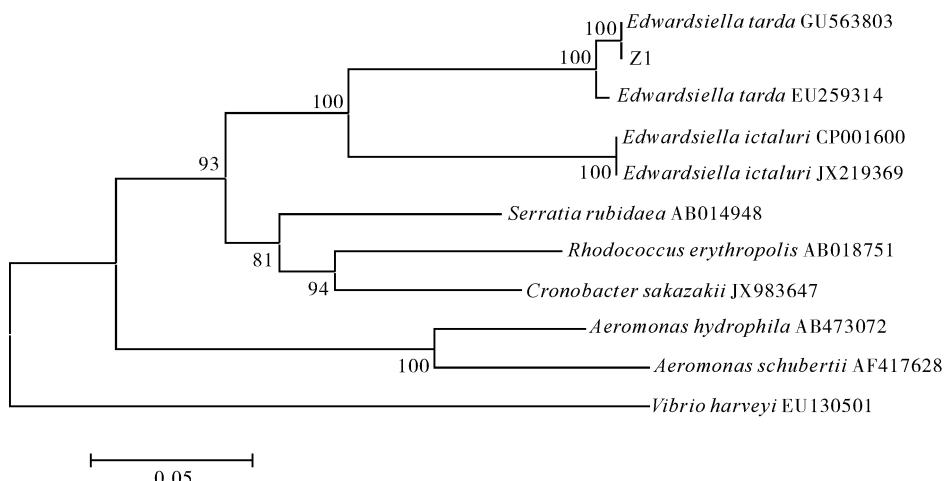


图2 基于gyrB基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequences

表1 人工感染试验结果

Table 1 Results of artificial infection experiment

试验鱼 Tested fish	菌液浓度/(cfu/mL) Concentration	试验鱼数 Number of tested fish	死亡尾数 Number of dead fish	死亡率/% Mortality
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	1×10^7	20	20	100
	1×10^6	20	18	90
	1×10^5	20	15	75
	1×10^4	20	5	25
	1×10^3	20	0	0
	对照 Control	20	0	0
透明四带无须魮 <i>Puntius tetrazona</i>	1×10^7	20	20	100
	1×10^6	20	16	80
	1×10^5	20	9	45
	1×10^4	20	2	10
	1×10^3	20	0	0
	对照 Control	20	0	0

2.4 药敏试验结果

分离菌株Z1对17种药物的敏感性测定结果见表2,结果表明:菌株Z1对青霉素、妥布霉素、阿米卡星、头孢唑林、庆大霉素、红霉素、呋喃妥因、头孢氨苄、卡那霉素、诺氟沙星、利福平11种药物敏感;对苯唑西林、链霉素、四环素、环丙沙星、洛美沙星、大观霉素6种药物耐受。

2.5 中草药体外抑菌试验

中草药提取物对分离菌株Z1的体外抑菌作用结果见表3。15种中草药提取物中五倍子、石榴皮的抑菌作用明显,MIC和MBC均 $\leqslant 6.25$ mg/mL;艾叶、决明子、乌梅、白头翁、黄连、大黄、黄芩有一定抑菌作用,MIC和MBC均在25~200 mg/mL;而野菊花、金银花、黄芪、甘草、苦参、黄柏的抑菌作用不明显,MBC>200 mg/mL。

表2 分离菌株Z1对17种药物的敏感性

Table 2 Chemotherapeutics sensitivities of the isolated strain Z1

抗菌药物 Chemotherapeutics	含药量(μg/片) Contents (μg/piece)	敏感性 ¹⁾ Sensitivity
青霉素 G Penicillin G	10	S
苯唑西林 Oxacillin	1	R
妥布霉素 Tobramycin	10	S
链霉素 Streptomycin	10	R
四环素 Tetracycline	30	R
阿米卡星 Amikacin	30	S
头孢唑啉 Cefazolin	30	S
庆大霉素 Gentamicin	10	S
红霉素 Erythromycin	15	I
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	R
头孢氨苄 Cefalexin	30	S
卡那霉素 Kanamycin	30	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	I
洛美沙星 Lomenfloxacin	10	R
利福平 Rifampicin	5	I
大观霉素 Spectinomycin	100	R

1) S: 敏感 Sensitive; I: 中等敏感 Intermediate; R: 抗性 Resistant.

表3 中草药提取物对分离菌株Z1的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

Table 3 The MIC and MBC of Chinese herb abstracts to the isolated strain Z1

mg/mL

中草药 Chinese herb	MIC	MBC	中草药 Chinese herb	MIC	MBC
艾叶 <i>Folium artemisiae argyi</i>	100	200	五倍子 <i>Galla chinensis</i>	0.78	1.56
野菊花 <i>Chrysanthemum indicum</i> L.	>200	>200	白头翁 <i>Pulsatilla chinensis</i>	100	200
金银花 <i>Lonicera japonica</i>	>200	>200	黄连 <i>Coptis chinensis</i> Franch.	25	50
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bge	>200	>200	大黄 <i>Rheum palmatum</i> L.	100	200
决明子 <i>Catsia tora</i>	100	200	黄芩 <i>Scutellariae baicalensis</i> Georgi	25	50
甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i>	200	>200	黄柏 <i>Phellodendri chinense</i> Schieid	200	>200
乌梅 <i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	50	100	石榴皮 <i>Pericarpium granati</i>	3.13	6.25
苦参 <i>Sophorae flavescentis</i>	200	>200			

3 讨论

本研究从患病的斑马鱼肝脏组织中分离到1株革兰氏阴性杆菌Z1,经回归感染证实其为斑马鱼病原菌,通过细菌的生物学特征和生理生化特性分析,初步鉴定该菌为迟缓爱德华氏菌。采用克隆该菌的16S rRNA、gyrB基因序列进行了同源性分析和系统发育树的构建,以进一步确定菌株Z1的分类地位。结果表明:该菌的16S rRNA、gyrB基因序列均与迟缓爱德华氏菌的同源相似性高于99.9%,在系统发育树上聚为一支,在分子水平上确定该分离菌为迟缓爱德华氏菌。

本研究采用了16S rRNA和gyrB基因对分离菌株进行同源性分析。Z1菌株的16S rRNA基因同源性与同属不同种的迟缓爱德华氏菌(EF683604、FJ405297、NR_024770)、鮰爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*) (AB050826、NR_024769)、保科爱德华菌(*Edwardsiella hoshinae*) (NR_024768)均高于99%,同源性太高而不能进行种间分类。gyrB基因属于信号通路中与DNA复制、限制、修饰和修复有关的蛋白编码基因,编码DNA促旋酶的B亚单位蛋白,对细菌DNA的转录和复制很重要。gyrB基因是单拷贝基因,序列长度约1.2~1.4 kb,平均碱基替换率为每100万年变化0.7%~0.8%,比16S rDNA的每5 000万年变化1%的速率要快^[11-13],而且不发生水平转移,并普遍存在于各种细菌中,满足了作为系统发育分析靶基因的要求,基于该基因序列的分析与DNA杂交同源性分析有较好的一致性,常用于细菌系统发育分析和鉴定^[14-15],因此特别适用于菌种间的区别和鉴定^[16-17]。本研究中Z1菌株与迟缓爱德华氏菌(EU259314、GU563803)gyrB基因同源性均高于98%;与鮰爱德华氏菌(CP001600、JX219369)gyrB基因同源性为85%,显示出较高的分辨率,证明

gyrB基因能很好用于爱德华氏菌属内种间分类及鉴定。

迟缓爱德华菌最早由Sakazaki和Murata在1959年从蛇(*serpentes*)中分离得到,1962年首次报道该菌感染鱼类(鳗鲡 *Anguilla japonica*)以来,该菌呈世界性分布,在非洲、美洲和亚洲已经有较多报道,可以感染鳗鲡^[18-19]、牙鲆(*Paralichthys*)^[3]、大菱鲆(*Psetta maxima*)^[20-21]等20多种食用鱼类,近年来也有发现观赏鱼地图鱼(*Astronotus ocellatus*)感染报道^[22],观赏鱼斑马鱼也有作为供试鱼进行该菌人工感染相关研究^[23-24],本研究发现迟缓爱德华氏菌引起养殖斑马鱼大量死亡。观赏鱼的养殖模式与食用鱼类不同,大多在小型水泥池或者室内鱼缸中进行,养殖环境相对比较封闭,2种观赏鱼的感染,说明迟缓爱德华氏菌具有较强的感染和传播能力,应引起水产养殖业足够的重视。

本文选取斑马鱼和透明四带无须鲃作为分离菌株人工感染试验的供试鱼,旨在确定本次分离菌株的致病力。透明四带无须鲃全身透明,体型侧扁,内脏清晰可见,相对普通鱼类动物模型更利于研究病原菌在鱼体内的入侵和病理变化过程^[25],是一种新型的水生实验动物。当感染菌液浓度达到 1×10^6 cfu/mL分别能引起斑马鱼、透明四带无须鲃90%和80%的死亡率,表明分离菌株Z1具有较强的致病性。

目前水产养殖中迟缓爱德华氏菌病的防治以抗生素为主,然而此类药物容易导致耐药性的产生^[26]。本研究中养殖场斑马鱼发病后,多种抗菌药物治疗没有效果,药敏试验发现分离的Z1菌株对17种药物中的6种药物不敏感,表现出较强的耐药性。由于观赏鱼养殖没有药物使用的限制,常常出现乱用和滥用抗生素药物的现象,更容易产生耐药菌株,这些耐药菌株传播到环境中,可能危害到其他动物及人类的安全。因而在食用鱼养殖规范用药的

同时,也应该规范观赏鱼养殖用药。

中草药具有抑菌效力、残留少、不易导致细菌产生耐药性,其作用除了直接抑杀病原微生物,还能通过调动机体的抗应激能力和提高免疫防御功能,达到预防疾病的目的。本次研究中,利用二倍稀释法测定的15种中草药对迟缓爱德华氏菌Z1的抑菌结果,可为今后筛选预防鱼类爱德华氏菌病的有效药物提供可靠的参考资料。本次试验结果发现石榴皮、五倍子对迟缓爱德华氏菌Z1具有较强的抑菌作用,这与陈言峰等^[27]、朱壮春等^[28]的研究结果一致。

参 考 文 献

- [1] JANDE J M, ABBOTT S I, KROSKE B S, et al. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1991, 29: 1997-2001.
- [2] CLAVIJO A M, CONROY G, CONROY D A, et al. First report of *Edwardsiella tarda* from *tilapias* in Venezuela[J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 2002, 22(4): 280-282.
- [3] 张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(1): 31-37.
- [4] SEONG B P, TAKASHI A, TAE S J. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish [J]. Veterinary Research, 2012, 43(1): 67.
- [5] TREDE N S, LANGENAU D M, TRAVER D, et al. The use of zebrafish to understand immunity[J]. Immunity, 2004, 20(4): 367-379.
- [6] HILL A J, TERAOKA H, HEIDEMAN W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity[J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1): 6-19.
- [7] 张德锋, 李爱华. 斑马鱼分枝杆菌病的研究概况[J]. 实验动物科学, 2009, 26(6): 64-67.
- [8] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Ninth edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] 中华人民共和国. WS/T 125-1999 中华人民共和国卫生行业标准, 纸片法抗菌药物敏感试验标准[S]. 1999-12-09 发布, 2000-05-01 实施. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [11] HUANG W M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes[J]. Annual Review of Genetics, 1996, 30: 79-107.
- [12] LA-DUC M T, SATOMI M, AGATA N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383-394.
- [13] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species detection in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 846-849.
- [14] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [15] MARA K, PETER K, BOZENA M K, et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(12): 2743-2751.
- [16] 侯晓丽, 曹清毅, 潘劲草, 等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 884-889.
- [17] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1119-1125.
- [18] ALCAIDE E, HERRAIZ S, ESTEVE C. Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 73(1): 77-81.
- [19] 薄清如, CARSON J, 黄新民, 等. 鳗鲡爱德华菌病的诊断和病原学研究[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 258-260.
- [20] 秦蕾, 王印庚, 张晓君. 迟钝爱德华氏菌感染大菱鲆的病理学研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 411-416.
- [21] 贾俊涛, 陈吉祥, 卢丽丽, 等. 1株迟钝爱德华氏菌的鉴定及毒力基因的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(8): 186-190.
- [22] 赵飞, 邹为民, 谭爱萍, 等. 地图鱼迟钝爱德华氏菌病病原菌的鉴定及毒力基因的检测[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(6): 403-408.
- [23] 彭国瑞, 王成龙, 王雪鹏, 等. 迟缓爱德华菌人工感染斑马鱼的致病性及组织病理学变化[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43(1): 23-26.
- [24] 王雪鹏, 丁雷, 邹兰柱, 等. 应用绿色荧光蛋白标记迟缓爱德华菌感染斑马鱼[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 433-436.
- [25] LI K B, CHANG O Q, WANG F, et al. Identification of a transparent mutant tiger barb *Puntius tetrazona* and its use for *in vivo* observation of a *Pleistophora* sp. (Microsporidia) infection[J]. Journal of Fish Biology, 2012, 80(7): 2393-2404.
- [26] 郑大海, 麦康森. 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 2004(1): 52-59.
- [27] 陈言峰, 邹记兴. 20种中草药对迟缓爱德华氏菌的体外抑菌试验[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(5): 110-113.
- [28] 朱壮春, 史相国, 张淑杰, 等. 中草药对牙鲆病原迟钝爱德华氏菌的体外抑制作用研究[J]. 水产科学, 2007, 26(5): 278-281.

Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio*

LIU Chun LI Kai-bin WANG Qing REN Yan SHI Cun-bin WU Shu-qin

Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province/Pearl River Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract The dominant bacterial strain, designated as Z1, was isolated from hepatopancreas of diseased *Danio rerio*. The biochemical and physiological characteristics of the isolated strain was studied by using conventional method, such as ATB Expression System (ID32 STREP), 16S rRNA and *gyrB* gene sequence. The results confirmed that the strain Z1 was *Edwardsiella tarda*. The challenge tests were carried out by artificially infecting *D. rerio* and *Puntius tetrazona* with the pure culture of the isolated strain. The symptoms of the artificially infected fish were similar to those infected naturally and the characters of the re-isolated strains were the same as the initially isolated strain. Antibiotic sensitivity test showed that among 17 antibiotics tested 11 were sensitive and 6 were resistant. The antibacterial activity of 15 Chinese herbs to pathogenic *E. tarda* (Z1) was determined *in vitro* by two fold dilution method. The results showed that *Galla chinensis* and *Pericarpium granati* were found to have significant inhibition on the bacterium with both minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) less than 6.25 mg/mL; *Artemisiae argyi*, *Catsia tora*, *Prunus mume* Sieb. et Zucc., *Pulsatilla chinensis*, *Coptis chinensis* Franch., *Rheum palmatum* L., *Scutellariae baicalensis* Georgi showed some extent inhibition on the bacterium with MIC and MBC of 25-200 mg/mL, but *Chrysanthemum indicum* L., *Lonicera japonica*, *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge, *Glycyrrhiza glabra*, *Sophorae flavescentis* and *Phellodendri chinense* Scheeid had no inhibition on the bacterium with MBC of more than 200 mg/mL.

Key words *Danio rerio*; *Edwardsiella tarda*; identification; phylogenetic analysis; artificial infection; antimicrobial susceptibility

(责任编辑:边书京)